

La biologie moléculaire offre un ensemble d'outils qui permettent d'analyser l'organisation de l'information génétique au niveau de l'ADN. Cet article étudie l'application de ces outils à l'amélioration génétique du caféier.

La biologie moléculaire en appui à l'amélioration génétique du caféier Arabica

Anthony F. ¹, Bertrand B. ², Lashermes P. ³, Charrier A. ⁴

¹ ORSTOM/CATIE/PROMECAFE, CATIE, Ap. 59, 7170 Turrialba, Costa Rica

² CIRAD-CP/PROMECAFE, IICA, Ap. 55, 2200 Coronado, San José, Costa Rica

³ ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

⁴ ENSAM/INRA, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

L'IICA/PROMECAFE ¹, le CATIE ² et la coopération française développent actuellement un programme régional d'amélioration génétique du caféier Arabica pour enrichir la base génétique des variétés cultivées en Amérique centrale. L'historique de l'introduction du caféier sur le continent américain (Chevalier et Dragon, 1928 ; Carvalho, 1946) montre que le matériel diffusé, ou en cours de diffusion, contient seulement les gènes d'une dizaine de caféiers sauvages. A cause de cette base génétique très étroite, les cultivars présentent un comportement homogène et des

problèmes encore plus sérieux, comme la sensibilité presque généralisée aux parasites et maladies (nématodes, scolyte du fruit, anthracnose du fruit,...) (Anthony *et al.*, 1995).

D'après leur définition la plus courante, les ressources génétiques du caféier Arabica sont composées de toutes les plantes avec lesquelles il peut échanger des gènes, c'est-à-dire les individus sauvages collectés dans le centre d'origine (Ethiopie, Kenya), les variétés et mutants sélectionnés dans divers centres de recherche, et les autres espèces de caféiers (genres *Coffea* et *Psilanthus*). L'espèce la plus connue pour l'amélioration de *C. arabica* est *C. canephora*. Elle a déjà fourni les gènes de résistance à la rouille aux Catimor et Sarchimor, via l'Hybride de Timor (Osorio Garcia, 1990 ; Aguilar, 1995), et possède des gènes de résistance à diverses espèces de nématodes

(1) Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura/Programa cooperativo regional para el desarrollo tecnológico y modernización de la caficultura, Ciudad Guatemala, Guatemala.

(2) Centro Agronómico Tropical para la Investigación y la Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.

du genre *Meloidogyne* (Anzueto *et al.*, 1996).

La biologie moléculaire offre un ensemble d'outils qui permettent d'analyser l'organisation de l'information génétique au niveau de l'ADN et sa traduction en protéines. Les marqueurs moléculaires sont nombreux, presque illimités, phénotypiquement neutres et peuvent révéler plus de polymorphismes que les marqueurs morphologiques. Ils ont permis d'obtenir des résultats spectaculaires sur l'organisation du génome de plusieurs plantes alimentaires, comme le blé, le maïs, la tomate,... (Weining et Langridge, 1991 ; Edwards, 1992 ; Michelmore, 1995).

Sur le caféier, les études moléculaires commencèrent à la fin des années 70 avec la révélation des isozymes (Berthou et Trouslot, 1978). De 1991 à 1994, un projet de la Communauté européenne (contrat CII*CT91-0899) qui associa le CATIE, l'ORSTOM³ et le SCRI⁴ permit le développement de nouvelles techniques pour étudier les ressources génétiques en Amérique centrale. La plupart des résultats présentés dans cet article furent obtenus dans le cadre de ce projet.

Evaluation de la diversité génétique

Deux types de marqueurs moléculaires ont été utilisés pour étudier la diversité génétique des espèces de caféier : les isozymes révélées par électrophorèse et les RAPDs (ADN polymorphe amplifié au hasard).

Les isozymes

Les enzymes sont des protéines qui catalysent les réactions chimiques des cellules. Elles proviennent de la traduction de l'information génétique portée par l'ADN, au cours de la synthèse des protéines. Les enzymes peuvent présenter diverses formes appelées isozymes qui ont la possibilité de se séparer, d'après leur poids et leur charge électrique, dans un gel placé dans un champ électrique (technique d'électrophorèse). La limitation dans l'utilisation des isozymes provient du fait qu'elles représentent une partie très réduite du génome et que leur nombre est limité par la disponibilité des colorants enzymatiques.

La structure de la diversité génétique de l'espèce *C. canephora* fut étudiée en utilisant sept systèmes enzymatiques (Berthaud, 1986). Les 471 individus analysés provenaient de populations naturelles et d'une collection gérée par l'Idefor DCC⁵ en Côte d'Ivoire. Les données obtenues permirent de classer les individus en deux groupes géographiques (figure 1) : l'un avec toutes les populations d'Afrique de l'Ouest (« les Guinéens ») et l'autre avec les populations d'Afrique centrale (« les Congolais »). La collection Idefor-DCC se classa avec le groupe d'Afrique centrale car la plupart des génotypes avaient cette origine. Une étude complémentaire révéla la présence de deux sous-groupes chez « les Congolais » (Montagnon *et al.*, 1992). Ces résultats ont été utilisés en Côte d'Ivoire pour mettre en place un nouveau programme d'amélioration du caféier *Canephora*, basé sur la création d'hybrides entre groupes (Leroy *et al.*, 1993).

Cette étude montre le potentiel de l'électrophorèse de protéines pour détecter le polymorphisme des espèces diploïdes de caféier. Cependant, cette technique n'a pas permis d'étudier la diversité de l'espèce tétraploïde *C. arabica* ($2n = 4x = 44$) : les zymogrammes contiennent de nombreuses isozymes mais présentent peu de variations entre individus (Berthou et Trouslot, 1978).

Les RAPDs

Les RAPDs sont des copies de fragments d'ADN produits au hasard (Welsh et McClelland, 1990 ; Williams *et al.*, 1990). La production de RAPDs se réalise en trois étapes :

- la dénaturation de l'ADN, c'est-à-dire la séparation des deux brins des molécules d'ADN ;

- l'union d'une amorce, constituée généralement par un segment de dix bases, à une séquence complémentaire d'un brin d'ADN (Adénine à Thymines et Cytosine à Guanine) ;
- et la synthèse d'un fragment complémentaire d'ADN à partir de l'une des extrémités de l'amorce, grâce à l'action d'une enzyme, la *Taq* polymérase.

Ces trois étapes sont répétées une quarantaine de fois, ce qui permet une amplification exponentielle des fragments synthétisés. Les RAPDs générés sont séparés par électrophorèse, colorés dans une solution de bromure d'éthidium et observés sous une lampe ultraviolette.

L'analyse de 20 individus de l'espèce *C. arabica* aboutit à la définition de trois groupes, formés par les individus sauvages d'Ethiopie et les variétés des deux groupes botaniques Bourbon et Typica (figure 2). D'après Lashermes *et al.* (1996c), les individus sauvages d'Ethiopie se séparèrent nettement des variétés cultivées et générèrent la majeure partie du polymorphisme détecté. Cependant, le nombre réduit de marqueurs utilisés n'a pas permis la caractérisation des variétés au sein de chacun des deux groupes botaniques. Le classement des deux individus sauvages du Kenya (Marsabit 3058 et 3099) (Anthony *et al.*, 1987) dans le groupe Bourbon devra être confirmé en augmentant le nombre de marqueurs.

Cette structuration de la diversité en trois groupes génétiques avait été observée dans une étude moléculaire préliminaire, avec d'autres origines de *C. arabica* (Orozco-Castillo *et al.*, 1994). Elle est confirmée par la vigueur des hybrides entre groupes, que ce soit chez les lignées Mundo Novo qui proviennent de croisements entre Typica et Bourbon ou chez les hybrides F1 entre indi-

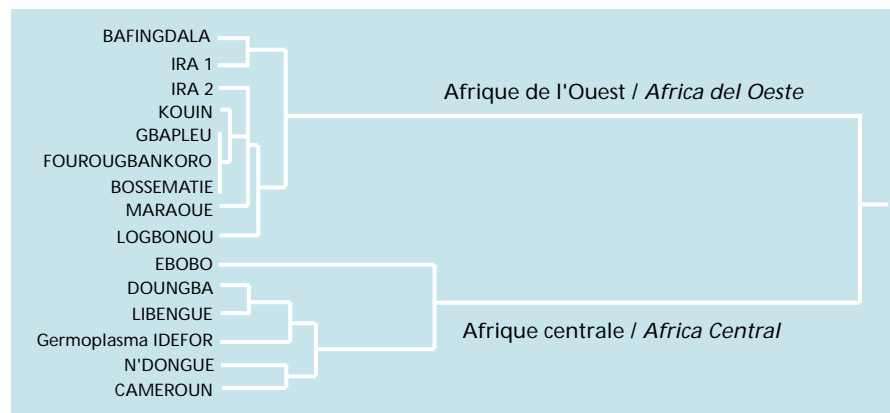


Figure 1. Structure de la diversité de l'espèce *C. canephora*, révélée par sept systèmes enzymatiques (Berthaud, 1986).
Estructura de la diversidad genética dentro de la especie *C. canephora* revelada por siete sistemas enzimáticos (Berthaud, 1986).

(3) Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération, Paris, France.

(4) *Scottish Crop Research Institute*, Dundee, Ecosse.

(5) Institut des Forêts - Département du café et du cacao, Abidjan, Côte d'Ivoire.

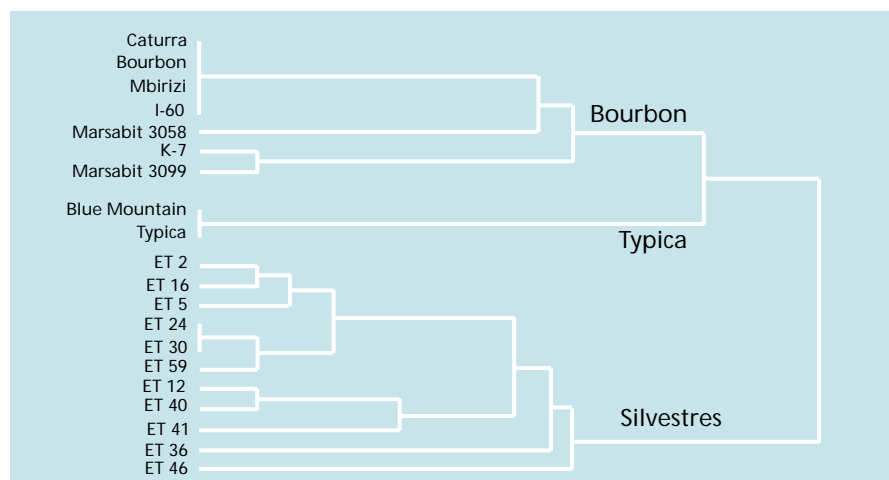


Figure 2. Classification de 20 individus de *C. arabica*, obtenue avec les données des marqueurs moléculaires RAPD (Lashermes *et al.*, 1996c).

Clasificación de 20 individuos de *C. arabica*, utilizando datos de marcadores moleculares RAPD (Lashermes *et al.*, 1996c).

vidus sauvages d'Éthiopie et variétés cultivées (Bouharmont, 1995 ; Bertrand *et al.*, 1997).

Les relations phylogénétiques

Les relations phylogénétiques s'étudient au niveau moléculaire en utilisant principalement les analyses de l'ADN chloroplastique (ADNcp) et de l'ADN ribosomique (ADNr) en raison du niveau d'informations que possèdent ces molécules. L'ADNcp constitue un matériel privilégié car il est abondant dans les chloroplastes, possède une très faible fréquence de changements structuraux et présente des séquences conservées, c'est-à-dire qui ont eu une évolution lente. Chez le caféier, l'ADNcp a une hérédité strictement maternelle (Lashermes *et al.*, 1996b). C'est pourquoi il peut être utilisé pour révéler la filiation maternelle de polyploïdes ou d'hybrides. L'ADNr est également intéressant parce qu'il permet d'étendre les résultats de l'ADNcp à d'autres génomes et parce qu'il produit des informations supplémentaires. Il se rencontre dans les génomes nucléaires, mitochondriaux et chloroplastiques de tous les organismes. En général, les séquences des régions non codantes sont variables alors que les séquences des régions codantes apparaissent plus conservées.

Les relations phylogénétiques entre espèces de caféiers ont été étudiées au moyen de l'analyse des sites de restriction, par les marqueurs RFLP (polymorphismes de longueur des fragments de restriction), et au moyen du séquençage de région d'ADN. La révélation des RFLPs (Botstein

et al., 1980) peut être décomposée en cinq étapes :

- la digestion de l'ADN par une enzyme de restriction ;
- la séparation des fragments d'ADN par électrophorèse ;
- le transfert des fragments séparés à une membrane de nitrocellulose ou de nylon (technique « Southern ») ;
- l'hybridation des fragments avec une sonde marquée qui contient une séquence spécifique de bases ;
- la visualisation des hybrides sonde / fragments d'ADN.

Le séquençage s'effectue au moyen des opérations suivantes (technique de Maxam-Gilbert) : isolement des deux brins d'un fragment déterminé d'ADN ; marquage d'une extrémité ; séparation de chaque échantillon en quatre lots et élimination d'une base (Adénine, Thymine, Cytosine ou Guanine) dans chacun des lots, ce qui provoque la cassure de la chaîne à l'endroit où la base a été éliminée ; comparaison du résultat du traitement de chaque brin et détermination de la séquence. Comme les séquences des bases sont complémentaires entre les deux brins, il est possible de vérifier la séquence de l'un avec celle de l'autre.

Le polymorphisme de l'ADNcp

La région entre les gènes *trnL* - *trnF* de l'ADNcp fut séquencée chez 38 individus qui représentaient 25 taxa de caféier (Cros *et al.*, 1997). Ces gènes codent les ARN de transfert de deux acides aminés (la leucine et la phénylalanine). Seulement 20 séquences distinctes furent observées. Pour obtenir une classification

relativement fiable, les données du séquençage furent complétées par celles du polymorphisme de l'ADNcp, détecté par les marqueurs RFLP (Lashermes *et al.*, 1996b). Les principales branches de la classification apparurent étroitement liées à l'origine des espèces (figure 3). Les deux individus de l'espèce tétraploïde *C. arabica* (sauvage ET-12 et Caturra) se classèrent avec *C. eugenioides* d'Afrique orientale et avec une nouvelle espèce d'Afrique centrale, *C. sp.* « Moloundou » (Anthony, 1992). *C. arabica* pourrait donc avoir le même ascendant maternel que ces deux espèces.

Le polymorphisme de l'ADNr

La région ITS 2 (espaceur transcrit interne) de l'ADNr nucléaire qui code les sous-unités 18S et 26S de l'ARNr fut séquencée chez 37 individus qui représentaient 32 taxa de caféier (Lashermes *et al.*, 1997). Comme pour la classification basée sur le polymorphisme de l'ADNcp, les principales branches furent étroitement liées à l'origine des espèces (figure 4). Cependant, les deux individus *C. arabica* se classèrent avec des espèces d'Afrique centrale et occidentale : *C. brevipes*, *C. canephora* et *C. congensis*. Par ailleurs, les deux espèces repérées par l'étude de la filiation maternelle, *C. eugenioides* et *C. sp.* « Moloundou », se classèrent ensemble mais séparées de *C. arabica*.

En conclusion, l'étude phylogénétique a permis de préciser les espèces génétiquement les plus proches de *C. arabica* et de confirmer son origine allotétraploïde. Elle conforte l'hypothèse émise par Lashermes *et al.* (1996c) que *C. arabica* pourrait provenir d'une hybridation entre deux espèces de *Coffea*, proches de *C. eugenioides* et de *C. canephora*. Les affinités entre *C. arabica*, *C. congensis* et *C. eugenioides* avaient déjà été observées par l'analyse de l'ADN mitochondrial (Berthou *et al.*, 1983).

Le marquage de caractères

Les résultats se rapportent à la détection d'introgessions naturelles et à la construction d'une carte génétique.

La détection d'introgessions naturelles

Deux fragments d'ADN résultant d'introgessions naturelles furent détectés par les RAPDs et vérifiés par hybridation moléculaire en les utilisant comme sonde :

- un fragment de 1 500 paires de bases, présent chez *C. canephora* et l'Hybride

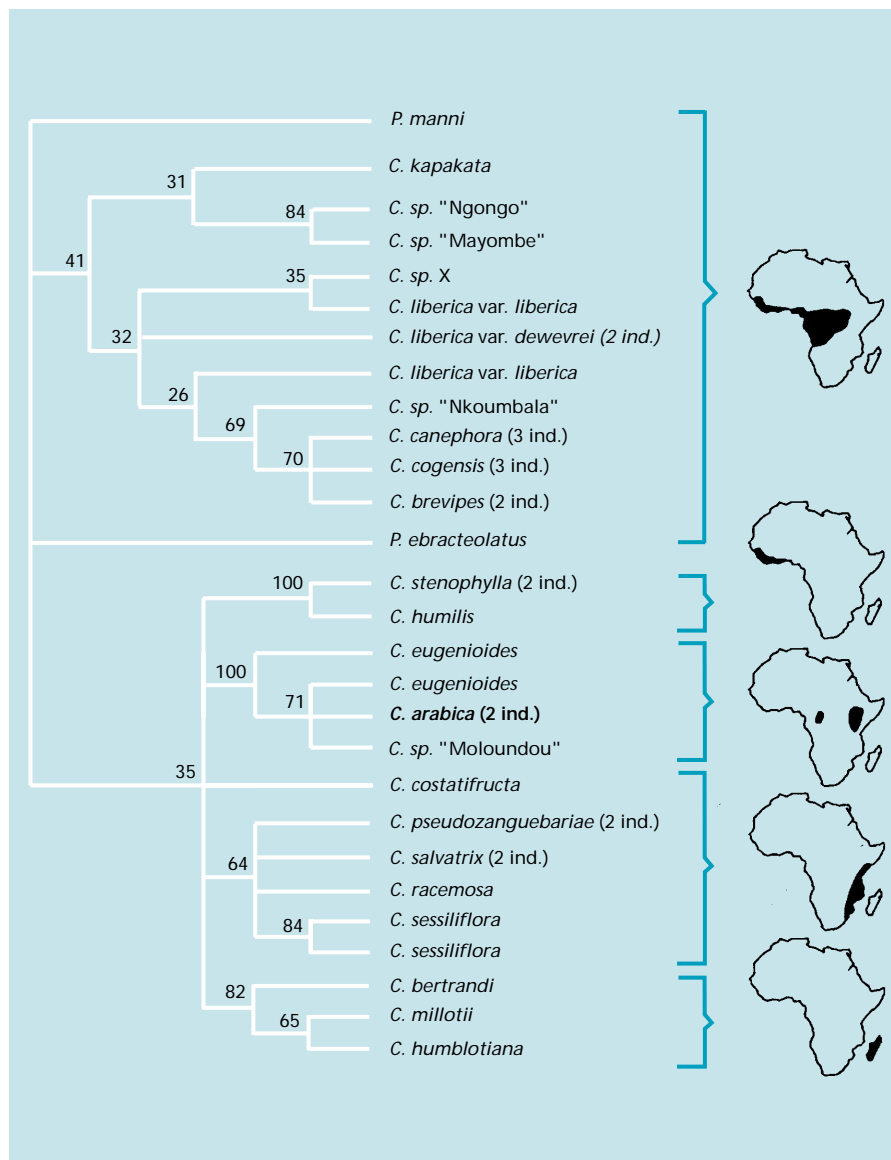


Figure 3. Classification phylogénétique de 25 taxa de caféier, sur la base du polymorphisme de l'ADNcp, et distribution géographique des principales branches de la classification (Cros *et al.*, 1997).
Clasificación filogenética de 25 taxa de cafeto, a través del polimorfismo del ADNcp, y distribución geográfica de los ramos principales de la clasificación (Cros *et al.*, 1997).

de Timor (832/1) mais absent chez *C. arabica* (Lashermes *et al.*, 1993) ;

- un fragment de 200 paires de bases, présent chez *C. canephora*, Rume Sudan (RS-510) et un Catimor (T.5175), mais absent chez *C. arabica* (Orozco-Castillo *et al.*, 1994).

La construction d'une carte génétique

Une carte génétique se présente comme une carte routière d'un pays, où les chromosomes sont les routes et les loci qu'ils portent sont les villes et villages (Phillips-Mora *et al.*, 1993). Les marqueurs moléculaires permettent de localiser les gènes qui

codent les caractères, le long des chromosomes.

La construction d'une carte génétique a commencé chez l'espèce *C. canephora*, avec une population en ségrégation d'haploïdes doublés (Paillard *et al.*, 1996). Les avantages de ce matériel sont sa structure diploïde ($2n = 2x = 22$) et le niveau de polymorphisme élevé des individus qui permet d'obtenir la ségrégation de nombreux caractères. La carte génétique contient actuellement 47 loci RFLP et 100 loci RAPD, situés sur 15 groupes de liaison. C'est une carte de densité moyenne (10 cM en moyenne entre marqueurs) qui peut déjà être utilisée pour localiser des gènes,

comme celui de l'auto-incompatibilité sur le groupe de liaison n° 9 (Lashermes *et al.*, 1996a).

Conséquences pour l'amélioration génétique

En raison du nombre réduit de marqueurs étudiés, les résultats qui ont été présentés doivent être interprétés comme des résultats préliminaires. Malgré cela, il est possible de dégager quelques conclusions importantes pour l'amélioration génétique du caféier Arabica :

- le classement du matériel sauvage, séparé des variétés qui proviennent du Typica et du Bourbon, confirme son intérêt pour élargir la base génétique du matériel cultivé. Cependant, le nombre réduit de marqueurs n'a pas encore permis d'estimer la distance génétique entre le matériel sauvage et les variétés cultivées ;
- l'analyse de la diversité génétique chez le matériel sauvage permettra de définir des groupes génétiques. La réalisation de croisements entre ces groupes fournira de nouveaux géniteurs pour la création variétale, qui pourront présenter une recombinaison de caractères intéressants ;
- l'introgession de gènes dans les variétés cultivées peut être tentée à partir de toutes les espèces phylogénétiquement proches de *C. arabica*, c'est-à-dire *C. brevipes*, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. eugenioides* et *C. sp.* « Moloundou » ;
- la création de variétés porte-greffes de *C. canephora*, résistantes aux principaux nématodes, doit être basée sur la réalisation de croisements entre individus d'Afrique centrale et d'Afrique occidentale. Les nouvelles variétés présenteront une vigueur hybride (hétérosis) qui pourra aider la croissance des caféiers Arabica greffés ;
- l'adaptation de la carte génétique à *C. arabica* permettra l'analyse génétique des caractères d'intérêt agronomique et la localisation de loci de caractères quantitatifs (*Quantitative Trait Loci*). L'identification de marqueurs moléculaires liés aux caractères intéressants constituera un outil très puissant pour le programme d'amélioration génétique parce qu'il sera possible d'effectuer une sélection précoce (en pépinière) des individus qui posséderont ces caractères et de ne planter en essai que les plantes ainsi présélectionnées. En développant une telle méthodologie, on peut espérer diminuer le coût du programme de sélection et accroître son efficacité. ■

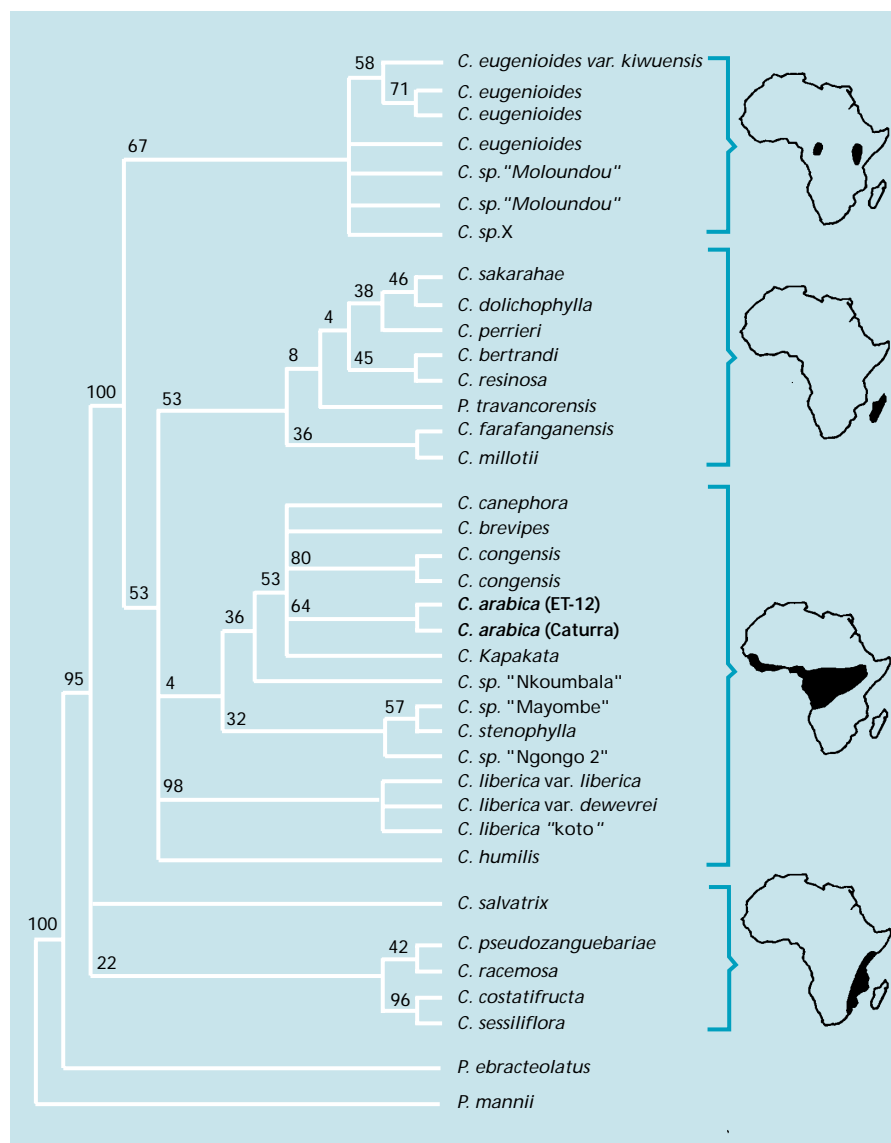


Figure 4. Classification phylogénétique de 32 taxa de caféier, sur la base du polymorphisme de l'ADNr, et distribution géographique des principales branches de la classification (Lashermes et al., 1997).

Clasificación filogenética de 32 taxa de cafeto, a través del polimorfismo del ADNr, y distribución geográfica de los ramos principales de la clasificación (Lashermes et al., 1997).

Remerciements

Les auteurs remercient M^{me} Irma Hernández de Phillips et M. Wilberth Phillips-Mora pour la relecture du manuscrit original, en espagnol, et le Dr Albertus Eskes pour ses précieux commentaires.

Bibliographie / Bibliografía

- AGUILAR G., 1995. Variedad Costa Rica. Convenio del Instituto del Café de Costa Rica y del Ministerio de Agricultura y Ganadería, San José, Costa Rica, ICAFE-MAG, 30 p. (document interne).
- ANTHONY F., 1992. Les ressources génétiques des caféiers : collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. Paris, France, ORSTOM, coll. Travaux & Documents Microédités 81, 320 p.
- ANTHONY F., BERTHAUD J., GUILLAUMET J. L., LOURD M., 1987. Collecting wild *Coffea* species in Kenya and Tanzania. Ressour. Gén. Vég. Bull. 69 : 23-29.

- ANTHONY F., BERTRAND B., DUFOUR M., ESCALANT J.V., 1995. Evaluación y caracterización de los recursos genéticos de café conservados en el germoplasma del CATIE. In : XVI simposio sobre la caficultura latinoamericana, Managua, Nicaragua, 25-29 oct. 1993. Tegucigalpa, Honduras, IICA/PROMECAFE, 6 p.
- ANZUETO F., BERTRAND B., PEÑA M., MARBAN-MENDOZA N., VILLAIN L., 1996. Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales nematodos de America Central. In : XVII simposio sobre la caficultura latinoamericana, San Salvador, Salvador, 23-27 octubre 1995. Tegucigalpa, Honduras, IICA/PROMECAFE, 7 p.

- BERTHAUD J., 1986. Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. Paris, France, ORSTOM, coll. Travaux et Documents de l'ORSTOM 188, 379 p.
- BERTHOU F., TROUSLOT P., 1978. L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea* : adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série ; premiers résultats. In : VIIIe colloque scientifique international sur le café, Abidjan, Côte d'Ivoire, 28 nov.-3 déc. 1977. Paris, France, ASIC, p. 373-383.

- BERTHOUS F., MATHIEU C., VEDEL F., 1983. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet. 65 : 77-84.
- BERTRAND B., SANTACREO R., AGUILAR G., ANZUETO F., ESKES A.B., 1997. El mejoramiento genético en América Central: ¿ la solución a todos los problemas ? In : Desafíos de la caficultura centroamericana, San José, Costa Rica, IICA (sous presse).
- BOTSTEIN D., WHITE R. L., SKOLNICK M., DAVIS R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32 : 314-331.
- BOUHARMONT P., 1995. La sélection du caféier Arabica au Cameroun, 1964-1991. Montpellier, France, CIRAD, coll. Documents de travail du CIRAD-CP 1-95, 131 p.
- CARVALHO A., 1946. Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie Arabica. Boletim da Superintendência dos Serviços do café 21 (230) : 174-180.
- CARVALHO A., 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors: *Coffea arabica*. In : Coffee, 4 : Agronomy, R. J. Clarke et R. Macrae éd., Londres, Royaume-Uni, Elsevier Applied Science, p. 129-165.
- CHEVALIER A., DAGRON M., 1928. Recherches historiques sur les débuts de la culture du caféier en Amérique. Communications et Procès Verbaux de l'Académie des Sciences Coloniales de Paris, 38 p.
- CROS J., COMBES M. C., TROUSLOT P., ANTHONY F., HAMON S., CHARRIER A., LASHERMES P., 1997. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L. Mol. Phylogenet. Evol. (sous presse).
- EDWARDS M., 1992. Use of molecular markers in the evaluation and introgression of genetic diversity for quantitative traits. Field Crops Res. 29 : 241-260.
- LASHERMES P., CROS J., MARMEY P., CHARRIER A., 1993. Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. Genet. Resour. Crop Evol. 40 : 91-99.
- LASHERMES P., COUTURON E., MOREAU N., PAILLARD M., LOUARN J., 1996a. Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre. Theor. Appl. Genet. 93 : 458-462.
- LASHERMES P., CROS J., COMBES M. C., TROUSLOT P., ANTHONY F., HAMON S., CHARRIER A., 1996b. Inheritance and restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA in the genus *Coffea* L. Theor. Appl. Genet. 93 : 626-632.
- LASHERMES P., TROUSLOT P., ANTHONY F., COMBES M. C., CHARRIER A., 1996c. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. Euphytica 87 : 59-64.
- LASHERMES P., COMBES M. C., TROUSLOT P., CHARRIER A., 1997. Phylogenetic relationships of coffee-tree species, *Coffea* L., as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Theor. Appl. Genet. 94 : 947-955.
- LEROY T., MONTAGNON C., CHARRIER A., ESKES A. B., 1993. Reciprocal recurrent selection applied to *Coffea canephora* Pierre 1. Characterization and evaluation of breeding populations and value of intergroup hybrids. Euphytica 67 : 113-125.
- MICHELMORE R., 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. Ann. Rev. Phytopathol. 15 : 393-427.
- MONTAGNON C., LEROY T., YAPO A., 1992. Etude complémentaire de la diversité génotypique et phénotypique des caféiers de l'espèce *Coffea canephora* en collection en Côte d'Ivoire. In : XIVe colloque scientifique international sur le café, San Francisco, Etats-Unis, 14-19 juillet 1991. Paris, France, ASIC, p. 444-450.
- OROZCO-CASTILLO C., CHALMERS K. J., WAUGH R., POWELL W., 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87 : 934-940.
- OSORIO GARCIA F. O., 1990. Evaluación de la estabilidad del rendimiento de introducciones en un ensayo regional de café. IX reunión regional de mejoramiento de café de PROMECAFE, Managua, Guatemala, IICA/PROMECAFE, 14 p. (document interne).
- PAILLARD M., LASHERMES P., PÉTIARD V., 1996. Construction of a molecular linkage map in coffee. Theor. Appl. Genet. 93 : 41-47.
- PHILLIPS-MORA W., RODRIGUEZ H., FRITZ P. J., 1993. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao, *Theobroma cacao*. San José, Costa Rica, CATIE, Serie Técnica, Informe Técnico 252, 183 p.
- WEINING S., LANGRIDGE P., 1991. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. Theor. Appl. Genet. 82 : 209-216.
- WELSH J., MCCLELLAND M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18 : 7213-7218.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.